

A METHOD OF OBTAINING LEAD AND ORGANOLEAD FROM CONTAMINATED MEDIA USING METAL ACCUMULATING PLANTS

Publication number: JP7508206T

Publication date: 1995-09-14

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: C02F3/32; C12S1/00; C22B3/18; C22B13/00;
C02F3/32; C12S1/00; C22B3/00; C22B13/00; (IPC1-7):
C02F3/32; C22B13/00

- european: C02F3/32B; C22B3/18; C22B13/00

Application number: JP19930505599T 19930628

Priority number(s): WO1993US05996 19930628; US19920908279
19920702

Also published as:



WO9401367 (A1)

EP0648192 (A1)

US5320663 (A1)

EP0648192 (A0)

Report a data error here

Abstract not available for JP7508206T

Abstract of corresponding document: **WO9401367**

It has been found that (Ambrosia sp.) and (Apocynum sp.) accumulate lead in the leaves, stems, and roots when it grows in soil containing organic or inorganic species of lead. Lead is accumulated in the leaves and stems to a greater extent than in most other plants. Lead can be economically recovered from contaminated soil and sludge by harvesting (Ambrosia sp.) or (Apocynum sp.) grown in media containing high concentrations of lead.

It has been found that Ambrosia sp. and Apocynum sp. accumulate lead in the leaves, stems, and roots when it grows in soil containing organic or inorganic species of lead. Lead is accumulated in the leaves and stems to a greater extent than in most other plants. Lead can be economically recovered from contaminated soil and sludge by harvesting Ambrosia sp. or Apocynum sp. grown in media containing high concentrations of lead.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-508206

第2部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)9月14日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 2 F 3/32		7305-4D	
C 2 2 B 13/00		8417-4K	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平5-505599
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)6月28日
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)12月30日
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 3 / 0 5 9 9 6
(87) 国際公開番号	W O 9 4 / 0 1 3 6 7
(87) 国際公開日	平成6年(1994)1月20日
(31) 優先権主張番号	9 0 8 , 2 7 9
(32) 優先日	1992年7月2日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)
(81) 指定国	EP (A T , B E , C H , D E , D K , E S , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , C A , J P

(71) 出願人	イー・アイ・デュボン・ドウ・ヌムール・ アンド・カンパニー アメリカ合衆国デラウェア州19898ウイル ミントン・マーケットストリート1007
(72) 発明者	カニンガム, スコット・ダニエル アメリカ合衆国ペンシルベニア州19317チ ヤズフォード・フェアビルロード245
(74) 代理人	弁理士 小田島 平吉 (外1名)

(54) 【発明の名称】 金属蓄積性植物を用いて汚染媒体から鉛及び有機鉛を得る方法

(57) 【要約】

アンブロシア種及びアボシヌム種は、鉛の有機又は無機種を含む土壌で生育せしめると葉、幹及び根に鉛を蓄積することが見いだされた。鉛は他のほとんどの植物の場合により多量に葉及び幹に蓄積される。高濃度の鉛を含む媒体中で生育させたアンブロシア種又はアボシヌム種を収穫することにより、汚染土壌及びスラッジから鉛を経済的に回収することができる。

請求の範囲

1. (1) アンブrosia種(Ambrosia sp.)又はアポシナム種(Apocynum sp.)の生育に適した条件下において有機又は無機鉛種を含む媒体中で1つのそれ以上のアンブrosia種又はアポシナム種植物を、植物部分が鉛を蓄積するのに十分な時間生育せしめ、

(11) 媒体から植物を収穫し、

(111) 鉛を濃縮する

段階から成る、鉛を含む媒体から鉛を得る方法。

2. 媒体が液体媒体、固体媒体、半固体媒体又はそれらの組み合わせである請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 植物の生育に必要な養分を媒体に加えることをさらに含む請求の範囲第1項に記載の方法。

4. 媒体が土壌、スラッジ又はたい肥である請求の範囲第2項に記載の方法。

5. 収穫を植物部分について行う請求の範囲第1項に記載の方法。

6. 収穫後に植物の生育を継続するのに十分な植物の部分が残る請求の範囲第5項に記載の方法。

7. 植物部分の脱水、焼却、熔融、好氣的消化又は嫌氣的消化により鉛の濃縮を行う請求の範囲第1項に記載の方法。

8. 鉛が植物の乾燥重量1kg当たり約100mg Pb～約8000mg Pbの濃度で蓄積される請求の範囲第1項に記載の方法。

9. アンブrosia種又はアポシナム種を2回又はそれ以上収穫する請求の範囲第1項に記載の方法。

10. (1) アンブrosia種又はアポシナム種の生育に適した条件下

において有機又は無機鉛種を含む媒体中で1つのそれ以上のアンブrosia種又はアポシナム種植物を、植物部分が鉛を蓄積するのに十分な時間生育せしめ、

(11) 媒体から植物を収穫する

段階から成る、鉛を含む媒体から鉛を得る方法。

明細書

金属蓄積性植物を用いて汚染媒体から鉛及び有機鉛を得る方法

発明の分野

本発明は多量の鉛をその組織中に蓄積して汚染土壌及び水を浄化する(remediate)能力を有する緑色植物の利用に関する。特に本発明はアンブrosia種(Ambrosia sp.) (ブタクサ)及びアポシナム種(Apocynum sp.) (バシクルモン)のこの能力における利用、及び鉛及び鉛含有(有機鉛)化合物の浄化に関する。

背景

近年、重金属による土壌及び地下水の汚染が重大な環境的危険として認識されてきた。重金属は比較的低濃度でほとんどの野生生物及び人間に毒性であることが知られている。鉛、白金、水銀、カドミウム、コバルト、亜鉛、銅、ひ素及びクロムなどの元素は多くの工業的用途で用いられ、有意量のこれらの金属が工業廃水中に見いだされることが多い。重金属は有害生物防除剤又は除草剤として用いられる有機ひ素及び有機銅、ならびに石油工業の副生成物として生産されるニッケルテトラカルボニル及びテトラエチル鉛などの有機形態でも見いだされる。

毒性化学品を含む土壌及び地下水の浄化のために多くの方法が記載されてきた。これらの方法は主に汚染媒体の濃縮及び除去又は封じ込め、あるいは毒素を酵素により不活性な形態に変換するための微生物の利用に集中している。Revis et al. (米国特許第4, 826,

602号明細書)は、廃水をシュードモナス マルトフィリカ(Pseudomonas maltophilica) ATCC 53510と接触させると重金属のイオン種の濃度が低下することを主張している。Colaruto et al. (米国特許第4, 511, 657号明細書)は危険性のある(obnoxious)廃棄物、特にハロゲン化有機化学品廃棄物(米国特許第4, 493, 895号明細書)の処理のために特別に適合させた培養微生物の利用につき記載している。

バイオリアクターの利用及び自生マイクロフロアのその場刺激は土壌及び地下水の汚染除去のために一般に行われている2つの方法である。バイオリアクターはトリクロロエチレン、フェノール及びトルエンを含む多様な毒性汚染物の生物浄化(bioremediation)のために微生物を用いるように設計された。(Folsom et al. 1991 Applied and Environmental Microbiology, 57:1602-1608)。その場生物浄化は、養分及び酸素を加えることにより増進する自生の汚染物一分解性微生物の育成を含む。Raymond (米国特許第3, 846, 290号明細書及び米国特許第4, 588, 506号明細書)は、汚染された環境に微生物を加えず、地下水を汚染している炭化水素の生物酸化を刺激するために酸素及び養分を供給する方法を記載している。

上記で引用した方法は有用であり、土壌及び水性環境の両方から毒性化合物を除去するために微生物を用いることができることを明らかに示している。しかし既存の文献において概略が示されている方法にはいくつかの欠点がある。文献に示されている実施例には、自然に存在する、又は遺伝子操作された特定のバクテリア又は酵母の培養物を用いた、あ

るいは自生微生物による生物学的処理の前に毒性汚染物の奇効な化学的予備処理を用いた環境の汚染除去が記載されている。特定の有機汚染物の分解のために特に選ばれた特定の微生物の単離又は操作、培養及び接種は労働集約的であり、時間の浪費である。バイオリアクターは養分添加、温度、pH及び湿度をより厳密に制御して有効な微生物成長を可能にすることができるが、生物浄化計画の場合、材料をポンプで押し出すか、又は掘り起こさねばならず、土壌を取り扱って分類しなければならず、これも労働集約的である。その場の方法を利用した生物浄化の試みは、ある種の毒性化合物の段階において有効であったが、金属及び有機金属汚染の特定の問題に向けられてはこなかった。これらの方法に伴う多くの問題は、土壌及び地下水を重金属種から浄化する簡単でより経済的に魅力のある方法のための緑色植物の利用に注目する動機を与えた。

多くの植物種がある種の金属をその葉、幹及び根に異なる程度で濃縮することがしばらく前から知られていた。(Baker et al., Ecophysiology of Metal Uptake by Tolerant Plants In: "Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects" A. J. Shaw (ed.) CRC Press (1989)) は、金属を含む環境への緑色植物の応答は金属種の能動的な排除から蓄積及びさらに過蓄積への耐性までの範囲に及び、過蓄積の場合は濃度が植物の乾燥成分の1%以上にも近付くことができることを記載している。植物による金属の蓄積及び過蓄積の現象は広範囲の植物群にわたって示されており、現在までのどの群のどの植物が金属蓄積体(accumulators)及び/又は過蓄積体として機能するかを

予想することができなかった。さらに問題を複雑にしているのは、1つの金属種の過蓄積体として分類することができる植物が他の金属種にはほとんど耐性であることができないという事実である。従って現象は植物の種類に特異的であるのみでなく、金属種に関しても特異的である。

(Baker et al., Ecophysiology of Metal Uptake by Tolerant Plants In: "Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects" A. J. Shaw (ed.) CRC Press (1989))。例えばアリスム(Alyssum)の種々の種が13400µgNi/gの量にも達するニッケルの過蓄積体であることが知られているが、他の金属の過蓄積体であるとは思われない。他方トラスビ種(Thlaspi sp.)はニッケル、亜鉛及び鉛を含む多様な金属の過蓄積を示す。今日までに鉛を蓄積する最大の能力が示されている植物はトラスビ ロッソジフロウム(Thlaspi rotundifolium)であり、植物の乾燥重量1g当たり8200µgのPbの量に達する。(Baker et al., Ecophysiology of Metal Uptake by Tolerant Plants In: "Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects" A. J. Shaw (ed.) CRC Press (1989))。多くの既知の過蓄積体の概要がBaker et al., Terrestrial high plants which hyperaccumulate metallic elements—a review of their distri-

bution, ecology and phytochemistry, Biorecovery, 1, 81, (1989)に記載されており、その記載事項は引用することにより本明細書の内容となる。

植物による金属の蓄積及び過蓄積の研究を取り巻く仕事は、金属汚染の指示体として、及び食物作物中の毒性金属蓄積を予防するための研究モデルとしてのこれらの植物の利用の領域に集中してきた。汚染環境から金属を抽出するための手段としての蓄積現象の利用の概念は、R. L. Chaney, Plant Uptake of Organic waste constituents In: "Land Treatment of Hazardous Wastes", Parr et al. (ed.) Noyes Data Corporation New Jersey (1983)により議論された。Chaneyは、ニッケル及び銅の過蓄積体がこれらの金属を乾燥植物重量の1%もの多量まで蓄積することが知られていることに言及し、土地処理部位(land treatment sites)からのこれらの金属の生物濃縮に用いることができると示唆している。しかしChaneyは生物濃縮を行う方法は記載していない。

Takashi Utsunomiya (日本特許公開57000190)は、汚染土壌で植物を栽培し、植物が成育のある段階に達した後、該土壌から植物を除去する段階により、汚染土壌から重金属、特にカドミウム及び水銀を除去するためにポリゴナセアエ(Polygonaceae)属の植物を含む種々の植物を用いることを記載している。Utsunomiyaはこれらの植物におけるある種のグリコシド化合物の存在と所望の金属を蓄積するその能力の間の、定量的な関連性も

記載している。Utsunomiyaは水性環境を金属汚染から浄化するために水耕系においてこれらの植物を利用することも予測している。Utsunomiyaの発明は、有機又は無機鉛の濃縮のためのこれらの植物の利用は記載していない。さらにUtsunomiyaにより用いられた植物は100ppm以下の量にしか金属を蓄積せず、有意な金属蓄積体であると考えられる植物の種類範囲外にあり、毒性金属の濃縮のためのこれらの植物の実際上の有用性に疑問がある。

M. Rogmans (ドイツ特許公開3921336)もカドミウム、鉛及び亜鉛を含む放射性汚染物から土壌を浄化するためのポリゴナム種(Polygonum sp.)の利用の方法を記載している。Rogmansは、高金属容量細胞系の選択及びこれらの細胞の再生による新規な高金属耐性植物の形成を介したポリゴナム種の重金属耐性株の生産も記載している。Rogmansはこの目的のためのアンブロシア種又はアポシテム種の利用は記載していない。

Menser, H. A. et al., Environmental Pollution 18(2), 87-95, (1979)は、市の埋め土から隔離した普通のブタクサ(アンブロシア アルテミシイフリア(Ambrosia artemisiifolia))及びヤナギタデ(ポリゴナム ペンシルバニカム(Polygonum pensylvanicum))を含む数種の植物の、Mn、Cu、Co及びPbを含む種々の重金属の濃度に関する分析を記載している。両植物に関して記録されたPbの最高濃度は植物の乾燥重量の3,68ppmであった。Menserはブタクサ又はバシクルモンによる鉛の蓄積又は過蓄積は記載していない。

土壌、水及び他の汚染媒体を重金属から浄化する目的に用いる植物に対する必要條件は、理想的にはそれが所望の重金属の蓄積体であり（すなわち地上組織中に少なくとも1000mg/kgの量を蓄積でき）、広範囲の天候及び環境条件に耐える頑丈な植物であり、成長が速くて成育季節当たりに数回の収穫ができることである。さらに水耕成育条件に容易に適応する植物はいくつかの利益を生ずる。そのような植物としてアンブrosia属（ブタクサ）及びアポシヌム属（バシクルモン）の植物を提供し、汚染土壌、水及び他の媒体を船及び有機船化合物から浄化する方法を提供するのが本発明の目的である。

発明の概略

本発明は有機及び無機形態の種々の種の船で汚染された土壌、水及び他の媒体を、

(1) アンブrosia種又はアポシヌム種の生育に適した条件下において有機又は無機船種を含む媒体中で1つ又はそれ以上のアンブrosia種又はアポシヌム種植物を、植物部分が船を蓄積するのに十分な時間生育させ、

(11) 媒体から植物を収穫し、

(111) 船を濃縮する

段階から成る方法により該船から浄化する(remediating)方法に関する。

発明の詳細な記述

本開示及び請求の範囲の範囲内で、多くの用語が用いられる。

“汚染媒体”という用語は地域的な周囲より多量の重金属、特に船を含む廃水、土壌、沈降物、スラッジ又はたい肥材料 (composted materials)、あるいは植物媒体を言う。

本発明は船の種々の有機又は無機種で汚染された土壌、地下水、廃水、水処理スラッジ及びたい肥材料を、アンブrosia属（ブタクサ）又はアポシヌム属（バシクルモン）の植物を作物の形態で生育させ、植物の葉及び幹の部分に船種を蓄積させることにより、浄化する方法を提供する。植物は収穫し、船種は環境的に受容できる回収又は廃棄のために加工する。

A. ビデンタタ (A. Bidentata) (ランスリーフ ブタクサ)、A. トメントサ (A. tomentosa) (スケレトンリーフ パーセージ)、A. グライ (A. grayi) (ウーリーリーフ パーセージ)、A. トリフィダ (A. trifida) (ジャイアント ブタクサ) 及び A. プシロスタキア (A. psilostachya) (ウェスタン ブタクサ) を含むいずれのアンブrosia種も用いることができる。しかし普通のブタクサである A. エラチオル (A. elatior) 又は A. アルテシイフォリア (A. arte. osoofolia) が最も好ましい。アポシヌム アンドロサエミフォリウム (A. pocynum androsaemifolium) (スプレディン グ バシクルモン) を含むいずれのアポシヌム種も用いることができるが、アポシヌム カンナビヌム (A. pocynum cannabinum) (ヘンバ バシクルモン又はインディアン バシクルモン) が最も好ましい。ブタクサ又はバシクルモンは作物定植 (crop setting) で種子から生育させることができ、あるいは未成熟の植物を用いることができる。植物の生育のための条件は変えることができるが、最も好ましいのは、植物の収穫可能な部分に最短時間で最大量の船を蓄積させる条件である。

“水耕”という用語は土壌ではなく、溶解した無機養分を含む水中における植物の栽培を言う。

“水耕溶液 (hydroponic solution)” という用語は水耕系で植物の生育の維持に用いられる液体媒体を言う。

“水耕系”という用語は、植物の根が液体と一定の接触を保てるように植物を挿入することができる場所を含み、液体を満たした層が組み込まれ、該層は流入口と流出口の両方を有し、該液体が変化する流量又は一定の流量で層を流れて循環することができる、植物を水耕により生育させる方法を言う。

“蓄積体”という用語は、Mが重金属の種である場合に100mgM/kg (植物組織の乾燥重量) より多量の重金属を蓄及び幹に蓄積する能力を有する緑色植物を言う。

“汚染物”という用語は、汚染媒体中に存在し、元素及びイオン種を含む重金属、及び関連有機金属化合物を含む毒性種を言う。

“片側施肥 (side dressing)” という用語は、畑の表面上に養分をばらまくのと反対に、成育中の植物に養分を適用することを言う。

“植物部分”という用語は、重金属を蓄積することができるいずれの部分も言い、葉、幹、花、果実、種子及び根が含まれる。

“過蓄積体”という用語はその乾燥重量1kg当たり10,000mg (1%) と等しいかそれより多量の金属種を蓄積することができる植物を言う。

“有機船”という用語は船と炭素置換基の両方を含む化合物を言う。

“有機船”と“有機船種”は同一の意味を有するものとする。

金属蓄積植物による浄化のために汚染部位を準備する場合、多くの因子を考慮する必要がある。一般に浄化の開始の前に克服すべき問題を決定するためにその部位の深さにおける評価が必要である。汚染物の深さは問題の植物の有効な根付きの深さ以内でなければならない、あるいは物理的手段によりその深さ以内にしなければならない。有効な根付きの深さは植物の遺伝子型、環境的因子 (水及び養分の利用性及び配置など) ならびに土壌断面内の物理的又は化学的制限に依存する。汚染物の濃度も重要であり、この方法による浄化の経費及び可能性を考慮する場合、調節層及び浄化のために許される時間の評価が因子となる。浄化を必要とする他の材料の存在ならびに植物の寿命へのその影響及び警告される人間の暴露量、ならびにその存在及び取り扱いに伴う環境的危険も考慮しなければならない因子である。

汚染媒体の種々の物理的及び化学的性質の評価は、その部位の初期の評価に含まなければならない。媒体は植物の生育を支持することができるだけでなく、あるいはそうできるようにしなければならない。この制限は濃度、透過性、剪断強さ、保水容量、酸素透過性、ならびに水平及び垂直断面の両方における可変性に関する意味を含んでいる。浄化すべき材料の物理的性質をこれらの必要条件に合うようにするのは、増量剤 (有機物質、スラッジ、たい肥など)、化学的成分 (硫酸カルシウム、石灰、硫酸など) の添加、あるいは機械的手段による土壌表面の物理的攪乱によることができる。

土壌の化学の種々の特徴も浄化法の効率に影響を与え、好ましい条件が植物の生育速度及び土壌中の船の生物-利用性の両方を最大にする。船の浄化の場合、土壌の好ましいpHはpH5~pH8の範囲である。

リン酸塩はブタクサ又はバシクルモンの生育にとって必要条件であり、土壌は植物の育成に適合する量にリン酸塩濃度を維持するよう改良される。しかし高濃度のリン酸塩はリン酸鉛の形成を促進し、それは鉛を沈殿させて植物が利用できる可溶性鉛の量を減少させるので、土壌中の鉛の溶解性に関してリン酸塩の添加を監視しなければならない。同様にしてアルカリ性土壌は急速に酸性化すると利用できる可溶性鉛の量を急速に増加させ、植物毒性を生ずるか、又は地下水に汚染を運送しめるので、急速に酸性化することはできない。鉛の生物-利用性を最大とし、植物の毒性を最小とするための土壌の化学的調節には、汚染媒体における鉛の濃度の測定及びそれに従う土壌の化学的改変の方法が含まれる。(Soil Testing and Plant Analysis, R. L. Westerman (ed.), Soil Science of America, Inc., Madison (1990) 及び Methods of Soil Analysis, Part 1 and 2, Chemical and Microbiological Properties, A. L. Page (ed.), Soil Science Society of America Inc., Madison (1982))。

ブタクサ又はバシクルモン作物の生育は、優れた植物育成と釣り合った方法で植物に施肥をし、水を与えることを必然的に伴う。種々の植物病原微生物、線虫、昆虫、雑草、草食動物などの抑制のために、植物の有害生物抑制プログラムも用いなければならない。植物の収穫は多様な方法で行うことができる。植物は生育季節の間に1回又はそれ以上収穫することができるか、あるいは数年間収穫せずに放置し、死亡又は生存

供給することにより、あるいは汚染されたブル又は閉じ込めた水中の浮遊マット上で植物を生育させることにより行うことができる。植物養分は汚染水に直接適用することができ、あるいは葉に適用することができる。養分、特にリン酸塩を適用する場合、汚染媒体中で鉛を沈殿させる濃度に通しないように注意が必要である。養分の濃度の調節は汚染媒体と植物組織中の養分及び鉛の濃度の測定により実験的に行われ、当該技術分野における熟練者に周知の方法により行うことができる。

実験室条件下でブタクサ又はバシクルモンの種子は発芽に対していくらか抵抗性であり得る。発芽を容易にするために、植える前に種子を処理するのが多くの場合有用である。植物成長調節剤、窒素化合物又は呼吸阻害剤を用いた処理、酸に種子を浸して種皮に浸透させること、及び種子を極端な温度に曝露する方法を含む種子の発芽を促進する多くの方法が既知である。最も好ましい方法は濃硫酸で種子を処理し、その後豊富な量の脱イオン水で迅速に濯ぎ、最後に種子を脱イオン水に終夜浸す方法である。

植物、及び鉛を含むと思われる土壌試料は、鉛の濃度を決定する前に、閉じ込められた鉛を放出する処理をしなければならない。灰化、酸消化及び鉛を含む鉛の放出の多くの方法が知られており、それらは Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice, H. M. Kingston (ed.) American Chemical Society, Washington (1988) 及び Soil Testing and Plant Analysis, R. L. Westerman (ed.), Soil Science of Amer

ican Chemical Society, Inc., Madison (1990) に要約が記載されている。最も好ましいのは、PROLABO (Questron Corp., Princeton NJ) により製造されたA-300モデルを代表とする開放容器マイクロ波ダイジェスターにおける消化である。消化するべき試料につき、マイクロ波放射からの急速な加熱と共に酸処理を行い、閉じ込められた鉛を放出させる。濃硝酸、及びその後濃過塩素酸を用いた処理が最も好ましい。

毒性重金属の分析のために多くの機器分析法が利用できる。最も普遍に用いられる方法に、フレイム・アンド・ファーンズ (flame and furnace) 原子吸光分析 (AAS) ならびにアノード・ストリッピングボルタメトリー (anode stripping voltametry) ならびにポーラログラフィー法がある。最も好ましいのは誘導結合型原子プラズマスペクトル分析 (inductively coupled atomic plasma spectroscopy) (ICP) であり、最も好ましい機器はSPECTROFLAME-ICP (Spectro analytical Instruments Inc., Fitchburg, MA) と類似の機器である。いずれのスペクトル分析法によって鉛の濃度を正確に決定するためにも、方法には類似の有機組成を有し、検出するべき既知の量の鉛を含む標準が組み入れられなければならない。いずれの適した標準も用いることができるが、National Institute of Science and Technology (NIST) から得られる既知量の鉛を含むPine Needle Standards 及びBuffalo River Sediment Standar

ca, Inc., Madison (1990) に要約が記載されている。最も好ましいのは、PROLABO (Questron Corp., Princeton NJ) により製造されたA-300モデルを代表とする開放容器マイクロ波ダイジェスターにおける消化である。消化するべき試料につき、マイクロ波放射からの急速な加熱と共に酸処理を行い、閉じ込められた鉛を放出させる。濃硝酸、及びその後濃過塩素酸を用いた処理が最も好ましい。

毒性重金属の分析のために多くの機器分析法が利用できる。最も普遍に用いられる方法に、フレイム・アンド・ファーンズ (flame and furnace) 原子吸光分析 (AAS) ならびにアノード・ストリッピングボルタメトリー (anode stripping voltametry) ならびにポーラログラフィー法がある。最も好ましいのは誘導結合型原子プラズマスペクトル分析 (inductively coupled atomic plasma spectroscopy) (ICP) であり、最も好ましい機器はSPECTROFLAME-ICP (Spectro analytical Instruments Inc., Fitchburg, MA) と類似の機器である。いずれのスペクトル分析法によって鉛の濃度を正確に決定するためにも、方法には類似の有機組成を有し、検出するべき既知の量の鉛を含む標準が組み入れられなければならない。いずれの適した標準も用いることができるが、National Institute of Science and Technology (NIST) から得られる既知量の鉛を含むPine Needle Standards 及びBuffalo River Sediment Standar

ds が最も好ましい。植物組織及び Sediment Standards につき、鉛を含むと思われる試料と共に酸消化及び ICP による分析を行う。

以下の実施例は本発明を例示するものであり、いかようにも本発明を制限するものではない。

実施例

実施例 1

鉛蓄積植物の同定

植物及び土壌試料消化：

植物組織中の鉛の濃度の決定のために、最初に組織を以下の方法により消化した。鉛を含むと思われる植物組織を 80℃ で 5 日間乾燥し、Wiley Mill (サイズ 10 メッシュ) を用いて粉砕した。200 μg の粉砕した植物組織を A-300 Automatic Microwave Digester (AMD) (PROLABO, (Quatron Corp., Princeton NJ) に入れた。AMD は 10 ml の濃硝酸を植物試料に加え、35% の動力が 10 分間適用された。続いて AMD は 5 ml の濃過塩素酸を試料に加え、35% の動力が 5 分間適用された。この直後に動力を 5 分間 40% に上げた。消化の後、10% の硝酸で試料を 50 倍に希釈し、0.45 μm フィルターを通して濾過し、SPECTROPLAME-ICP (Spectro Analytical Instruments Inc. Fitchburg, MA) 上で鉛含有量を決定した。NIST から得た植物組織標準につき同一の消化法及び ICP 分析を行い、鉛分析のための標準として用いた。植物組織のために用いた NIST 標準は 10.8 mg Pb

b/kg を含む Pine Needles (ロット番号 1575) であり、植物組織 1 キログラム当たりのミリグラム鉛 (mg Pb/kg) を算出する標準として用いた。

土壌中に束縛された鉛は比較的消化を受け難く、消化法において追加の過塩素酸段階を必要とする。鉛を含むと思われる土壌を空気乾燥し、0.5 g の試料を AMD に入れた。AMD は 10 ml の濃硝酸を試料に加え、35% の動力が 10 分間適用された。この直後に動力を 3 分間 40% に上げた。続いて 5 ml の濃過塩素酸を試料に加えられ、ダイジェスターは 8 分間、40% の動力に保持された。この後、40% の動力で追加の 3 分間、さらに 2 ml の過塩素酸が加えられた。消化の後、10% の硝酸を用いて試料を 50 倍に希釈し、0.45 μm シリジフィルターを通して濾過し、ICP を用いて鉛含有量を測定した。161 mg Pb/kg を含む NIST から得た Buffalo River Sediment Standards (ロット番号 2704) につき土壌試料と同一の消化法及び ICP 分析を行い、植物組織 1 キログラム当たりのミリグラム鉛を算出する標準として用いた。

量分経度：

容易に入手できる量分を用い、低リン酸塩量分育成媒体を準備した。組成は下表 I に示す。

2 リットル の量分 成分	2 リットル の量分に 加えられる成分のグラム数	材料の 式量	最終濃度 に達する 量分/l	最終濃度 に達する 元素	最終濃度 (ppm)	最終濃度 に達する 元素	最終濃度 (ppm)
1	0.32 K ₂ PO ₄	136.09	1	P	0.010	Fe	10.4
2	202.0 KNO ₃	101.1	1	K	1.5	Mn	1.0
3	491.0 MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246.5	1	Ca	2.0	Cu	1.0
4	472.0 Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	236.16	2	Mg	1.0	Zn	0.2
5	5.6 FeSO ₄ · 7 H ₂ O	278.02	1	S	1.0		1.0
6	18.6 Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	372.24	1	H	5.0	Mo	0.2
7	74.6 ZnCl ₂	74.55	1	Cl	0.5	W	0.13
8	0.124 H ₃ BO ₃	61.84	1			Co	0.13
9	0.138 Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	159.01	1			Pb	25.0
10	0.576 Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	287.34	1				4.8
11	0.180 CuSO ₄ · 5 H ₂ O	249.75	1				
12	0.576 Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	287.34	1				
13	0.460 CuCl ₂ · 2 H ₂ O	237.71	1				
14	0.960 H ₂ EDTA · 2 H ₂ O	372.24	1				
15	3.2 Pb(NO ₃) ₂	331.20	1				
16	162.55 Pb (重量による)	162.55	1				
17	11 g/l Pb = 1000 ppm	11 g/l	1				

鉛蓄積植物の同定

鉛で汚染された部位からの 100 種類の植物試料を、各植物から葉及び幹を取ることににより無作為に集めた。各植物試料からの葉及び幹を 80℃ で 5 日間乾燥し、10 メッシュのサイズのスクリーンを有する Wiley Mill を用いて粉砕した。粉砕の後、200 μg の試料を上記で概略を示した方法を用いて消化した。消化の後、ICP を用いて鉛含有量を決定し、データを表 II にまとめる。データからわかる通り、2つの種 (アンブrosia 種 (ブタクサ) 及びアボシム (バシクルモン)) のみが鉛の蓄積体の可能性があると同定された。ブタクサは 1 kg 当たり合計 839 mg の量の Pb を有し、根の場合は 2000 mg Pb/kg 以上の値を有した。ヘンバ バシクルモンは植物の地上部分で 349 mg Pb/kg の量に達した。この初期スクリーニングで鉛の量に関して調べた他の植物のすべての中のほとんどが分類的に同定されず、試料が表 II に示すデータを有するのみである。しかし未同定の植物のいずれも、分析した試料において 10~15 mg Pb/kg 以上の鉛の量を確証しなかった。このデータに基づき、汚染媒体からの鉛の浄化の場合、ブタクサが最も可能性を有するとして同定された。

表 II

日付	試料番号	植物の 種類	ICP 数	検出因子	標準曲線 範囲	合計 mg Pb/kg
8/30/91	56-3 葉及び 幹	普通の ブタクサ	17.2	50	0-20	839
9/14/91	下部の葉	普通の ブタクサ	0.27	50	0-20	434
9/14/91	下部の葉	普通の ブタクサ	10.4	50	0-20	490

特表平7-508206 (7)

9/14/91	根	普通の ブタクサ	43.1	50	0-20	2125
9/14/91	根	普通の ブタクサ	42.9	50	0-20	2115
8/29/91	94. 葉及び 幹	ヘンブ バシクルモン	7.14	50	0-20	349
8/27/91	10. 葉及び幹		-20.3	50	0-1000	0
8/27/91	41. 葉及び幹		-12.8	50	0-1000	0
8/27/91	61. 葉及び幹		-8.65	50	0-1000	0
8/28/91	84. 葉及び幹		0.643	50	0-20	7
8/27/91	9. 葉及び幹		-18.6	50	0-1000	0
8/27/91	29. 葉及び幹		-9.44	50	0-1000	0
8/27/91	37. 葉及び幹		-6.81	50	0-1000	0
8/27/91	44. 葉及び幹		-5.38	50	0-1000	0
8/27/91	54. 葉及び幹		-8.35	50	0-1000	0
8/27/91	55. 葉及び幹		-9.91	50	0-1000	0
8/27/91	59. 葉及び幹		-12.3	50	0-1000	0
8/27/91	66. 葉及び幹		-16.5	50	0-1000	0
8/27/91	67. 葉及び幹		-5.93	50	0-1000	0
8/27/91	70. 葉及び幹		-10.4	50	0-1000	0
8/27/91	72. 葉及び幹		-10	50	0-1000	0
8/27/91	76. 葉及び幹		-7.37	50	0-1000	0
8/27/91	77. 葉及び幹		-14.9	50	0-1000	0

実施例2

鉛汚染土壌試料からのブタクサにおける鉛蓄積

ブタクサ種子の発芽:

表III

植物の種類	植物部分	合計mg Pb/kg
ブタクサ	葉	1251
ブタクサ	上部幹	7.75
ブタクサ	下部幹	218

データは、ブタクサが土壌から葉の組織に1kg当たり1251mgのPbを蓄積できることを示している。

実施例3

水耕系におけるブタクサ、バシクルモン及びテンサイによる鉛蓄積の比較

ブタクサ、テンサイ及びヘンブ バシクルモン植物を、表Iに記載の低リン酸塩養分媒体を含む2ガロンの水耕灌漑系の2つに入れた。系に酸素を与え、液体を混合するために動くバブラー管をポンプから挿入した。実験植物に養分溶液中でその1kg当たり1mgの一定量のPbを与えたが、標準植物の養分溶液はPbを含まなかった。実験及び標準植物をPGR-15成育室(Conviron Corp., Asheville, NC)において、昼時間が16時間であり、昼時温度が25℃及び夜時温度が20℃であり、光の強度が980μEinstein/m²/秒という同一条件下で30日間成育した。養分媒体の灌漑は両方の系において8ml/時で開始した。灌漑の流量は11日目15ml/時に増加させ、19日目に再度15ml/時から30ml/時に増加させた。実験の継続中ずっと、実験系全体の鉛の濃度は1mg Pb/kgに維持した。両方の系からの流出を鉛の分析のために集めた。30日の最後に植物を収穫し、葉、幹及び根を鉛の含有量につき分析した。

ブタクサ種子は発芽に対して抵抗性であり得、実験室条件下で種子の発芽の速度を増すために以下の処置を用いた。ブタクサ種子を濃硫酸に30分間浸した。続いて種子を脱イオン水の急流浴で1分間濯ぎ、その後500mlの脱イオン水に終夜浸した。この方法の最後に種子を正常なインキュベーション条件下で植え付けた。

鉛汚染土壌からの鉛の蓄積:

土壌試料を鉛汚染部位から集め、実施例1に概略を示した方法に従って鉛含有量につき分析した。汚染部位からの土壌中の鉛含有量は7500mg Pb/kgであることが測定された。汚染部位からの土壌を室温で空気乾燥した。上記の方法により発芽させ、続いて非汚染土壌で成育したブタクサの実生を汚染土壌に移植し、表Iに定義された低リン酸塩養分媒体を用いて毎日水やりをした。実生の同一の1組を、正常な植物成育の指示体として鉛を含まないMETROMIX鉢植土壌(Grace/Sierra Horticultural Products Co., Milpitas, CA)に移植した。すべての植物をPGR-15成育室(Conviron Corp., Asheville, NC)中で、光の強度が980μEinstein/m²/秒であり、25℃の昼温及び20℃の夜温において16時間が昼という条件下で30日間成育した。30日後に植物を収穫し、鉛の濃度を実施例1に記載の通りに植物の幹及び葉において決定した。葉及び幹における鉛の蓄積を示すデータを下表IIIにまとめる。鉛汚染土壌で成育した植物及び鉛-非含有METROMIX鉢植土壌で成育した植物の目視検査は、鉛汚染土壌で成育した植物の健康又は成育に明らかな悪影響がなかったことを示した。

データを下表IVにまとめる。

表IV

実験

植物の種類	植物部分	合計mg Pb/kg
バシクルモン	葉	0.92
バシクルモン	幹	4.10
バシクルモン	根	68.20
テンサイ	葉	10.04
テンサイ	根	79.76
ブタクサ	葉	4.76
ブタクサ	幹	22.84
ブタクサ	根	46.92

標準

植物の種類	植物部分	合計mg Pb/kg
バシクルモン	葉	0
バシクルモン	幹	0
テンサイ	葉	0.64
テンサイ	根	0.32
ブタクサ	葉	0
ブタクサ	幹	0
ブタクサ	根	0

データからわかる通り、ブタクサは合計鉛蓄積の37.0%を葉及び幹に蓄積するが、テンサイはわずか11.2%を蓄積し、ヘンブ バシクルモンは8.8%を蓄積する。テンサイは合計で他の2つの植物のい

ずれよりも多くの船を蓄積する傾向があったが、船は細かい根系に濃縮された。かくしてブタクサは植物の収穫可能な地上部分に船を蓄積する3〜6倍大きな能力を示すので、ブタクサが最も好ましい蓄積体である。

実施例4

ブタクサによる有機船の蓄積

船汚染部位から集めた水を船の濃度に関して分析し、合計で14.92 mg Pb/kgの船を含み、その中の10.08 mg Pb/kgが有機船であることが見いだされた。有機船濃度は以下の方法で決定した。有機船を含むと思われる水を0.45 μのGelmanシリンジフィルターを通して濾過し、NaOHを用いた滴定によりpHを9.0に調節した。このpHで無機鉛は溶液から析出する。溶液を再度0.45 μ Gelmanシリンジフィルターを通して濾過し、ICPを用いて船の濃度を決定した。

実験系及び標準系の2つの水耕系を、有機船で汚染された水から鉛種を蓄積するブタクサの能力を調べるために組み立てた。実験系は5つのブタクサの発生を含んだが、標準系は植物を含まなかった。0時の時点で、両方の系に鉛を含まない低リン酸塩分媒体(表I)を30 ml/時の一定の流量で灌漑した。

実験の経過中ずっと、標準系及び実験水耕系の両方に船汚染水を導入し、各系における水耕溶液を周期的間隔で鉛の含有量に関して分析した(表V)。実験は昼時間が16時間及び100%蛍光下という育成条件下の室温で113時間行った。113時間の最後に植物を収穫し、根、葉及び幹を実施例1の方法に従って鉛の含有量に関して分析した。データを表VIにまとめる。

部位の準備:

農場経営団体のほとんどに既知の物理的、化学的、又は燃焼法により非金属蓄積植物のほとんどを除去することにより、浄化するべき部位を準備する。種子又は発生を導入できるように土壌を物理的に攪乱する。この物理的攪乱は部位全体、又は植え付けの直接の領域のみに行うことができる。物理的攪乱は農業経営及び造園において普通に行われる多くの機械的及び手動法により行うことができる。土壌の改良はこの操作の前に行われるが、これらの改良を植え付け時に、又は植物が生育する時に「片側施肥」として行うこともある。畑の表面は、水の保持又は分散を容易にするために畝、あぜみぞ又は外周(contour)などの物理的特徴が必要な場合以外は比較的平らなままとする。

植え付け:

ブタクサ又はバシクルモンの種子、胚、発生又は移植植物の植え付けは手動で、又はそのような目的で設計された機械を用いて行われる。植え付けの深さは種子の寸法及び土性によって農業及び園芸の実行に慣れた者に十分理解される方法で変える。肥料の添加物などの土壌改良物は、植え付け溝、あぜみぞ、又は穴の中、側又は下に、植え付け法の前、その間又は後に置く。

育成/保持:

ブタクサ又はバシクルモン植物に適宜肥料を与え、水やりをする。これらの適用の時期及び種類は、土壌条件ならびに色、高さ、形及び膨脹などの植物の健康に関する視覚による手探りに基づく。これらの適用の時期及び種類は葉の組織の元素分析に基づく勧告を考慮に入れなければならない。これらの方法はステート・エキステンション・アグリカル

表 V

時間/時	標準/溶液中の合計 mgPb/kg	実験/溶液中の合計 mgPb/kg	実験による標準に対する鉛の%減少
0	0	0	0%
15	4.15	1.50	64%
40	9.28	2.81	70%
66	9.38	3.40	64%
86	9.99	3.60	64%
91	9.80	3.38	66%
113	9.91/有機 0.13 (13%)	3.36/有機 1.70 (51%)	66% 82% 回収された有機船

* 0時の時点で船汚染水は合計で14.92 mg Pb/kgという初期値を有し、10.08 mg Pb/kgが有機船であると決定された。

表Vからわかる通り、ブタクサ植物はわずか15時間後に汚染水試料の鉛含有量における64%減少を担い、その減少の程度は実験の継続中ずっと維持された。実験の最後に合計船濃度及び有機船濃度の両方を標準系及び実験水耕溶液につき決定した。両方の場合に合計鉛の測定値は有機船の濃度に対応し、有機船が水耕溶液から浄化されたことを示した。表VIに示す根、葉及び幹の鉛含有量の分析に関するデータは、植物による鉛の蓄積が汚染水試料の鉛濃度の減少を担ったことを示している。

表 VI

植物の種類	植物部分	合計 mg Pb/kg
ブタクサ	葉及び幹	25.36
ブタクサ	根	418.40

かくしてブタクサの利用は液体媒体からの鉛の浄化に有効である。

実施例5

ブタクサ又はバシクルモン作物を用いた船汚染部位の浄化

チユアリスツ(state extension agriculturists)及び農業団体(farming community)の多くに良く知られている。植物-有害生物抑制プログラムを用いる。これには昆虫、線虫、植物病原体、雑草及び草食動物の抑制が含まれる。特定の植物有害生物の除去又は抑制のための勧告は、地方の群衆顧問、農業製品販売者ならびに多数の本及び雑誌から得ることができる。

収穫:

植物は生育季節の間に1回又はそれ以上収穫する。植物は収穫装置を用い、得られる最大量の船を除去できる方法で収穫する。これは生牧草、干し草、まぐさ、皮腐、穀物、糠又はバイオマスとしての利用を目的とする作物を育てている農民に良く知られた収穫法及び装置を含む。

収穫後加工:

材料の収穫後加工には植物組織中の鉛を環境的に受容できるように改善又は廃棄する1段階か又はそれ以上の段階が含まれる。収穫されたバイオマスは、鉛を含む濃度の低い体積の大きな燃焼可能な材料の取り扱いと調和した設計の焙焼機により直接加工する。鉛濃度、濃密度を増し、全体の体積を減少させる予備加工段階が必要な場合、以下を用いる。バイオマスの濃縮は、好氣的消化(例えばたい肥パイル)、嫌氣的消化(例えば密閉槽)、焼却(例えば灰化)、粉砕、切断、ペレット化又は化学的(湿式)消化(酸処理)を含む方法により行う。

収量:

1エーカーのブタクサ又はバシクルモンが1年に15〜30トンの乾燥重量のバイオマスを生産することが予想される。その乾燥重量の0.2%〜2%の多くが蓄積鉛を構成していることも予想される。これは

汚染土壌から1年に1エーカー当たり約501b~12001bの鉛を
浄化することになる。

前記の記載から、当該技術分野における熟練者は本発明の必須の特徴
を容易に突き止め、その精神及び範囲から逸脱することなく種々の用途
及び条件に適応させるための本発明の種々の変更及び修正を行うことが
できる。

特表平7-508206 (9)

補正書の写し(翻訳文)提出書(特許法第184条
の7第1項)

平成6年12月30日

特許庁長官 高 島 章 殿

1. 特許出願の表示

PCT/US93/05996

2. 発明の名称

金属蓄積性植物を用いて汚染媒体から鉛及び有機鉛を得る方法

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国デラウェア州19898ウィルミントン・
マーケットストリート1007

名 称 イー・アイ・デュボン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー

4. 代 理 人 〒107

住 所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日 本 自 転 車 会 館

氏 名 (6078)弁護士 小田 島 平 吉

電 話 3585-2256

(ほか1名)

5. 補正書の提出年月日

1993年11月5日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通



請求の範囲

1. (i) アンブrosia種(Ambrosia sp.)又はアポシナム種(Apocynu
m sp.)の生育に適した条件下において有機又は無機鉛種を含む媒体中で
1つ又はそれ以上のアンブrosia種又はアポシナム種植物を、植物部分
が鉛を蓄積するのに十分な時間生育せしめ、

(ii) 媒体から植物を収穫し、

(iii) 鉛を濃縮する

段階から成る、鉛を含む媒体から鉛を得る方法。

2. 媒体が液体媒体、固体媒体、半固体媒体又はそれらの組み合わせ
である請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 植物の生育に必要な養分を媒体に加えることをさらに含む請求の
範囲第1項に記載の方法。

4. 媒体が土壌、スラッジ又はたい肥である請求の範囲第2項に記載
の方法。

5. 収穫を植物部分について行う請求の範囲第1項に記載の方法。

6. 収穫後に植物の生育を継続するのに十分な植物の部分が残る請求
の範囲第5項に記載の方法。

7. 植物部分の脱水、焼却、熔融、好氣的消化又は嫌氣的消化により
鉛の濃縮を行う請求の範囲第1項に記載の方法。

8. 鉛が植物の乾燥重量1kg当たり約100mg Pb~約8000
mg Pbの濃度で蓄積される請求の範囲第1項に記載の方法。

9. アンブrosia種又はアポシナム種を2回又はそれ以上収穫する請
求の範囲第1項に記載の方法。

10. (i) アンブrosia種又はアポシナム種の生育に適した条件下

において有機又は無機鉛種を含む媒体中で1つ又はそれ以上のアンブ
rosia種又はアポシナム種植物を、植物部分が鉛を蓄積するのに十分な時
間生育せしめ、

(ii) 媒体から植物を収穫する

段階から成る、鉛を含む媒体から鉛を蓄積する方法。

国际调查报告

PCT/US 93/05996

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No.	
According to International Patent Classification (IPC) or to Euro Patent Classification and EPC		PCT/US 93/05996	
Int.Cl. 5 C02F3/32; C22B13/00			
2. FIELD OF SEARCH			
Classification System		Minimum (International) Standard	
Int.Cl. 5		C02F; C22B	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to Claim No.	
A	WATER RESEARCH. vol. 24, no. 2, February 1990, OXFORD GB pages 177 - 183 JALIL, S.K. ET AL. see page 177, column 2, paragraph 2-3	1-4, 10	
A	ENVIRONMENTAL POLLUTION vol. 18, no. 2, February 1979, BANKING, ESSEX, ENGLAND pages 87 - 95 NEWSEN, H.A. ET AL. cited in the application see page 88, last paragraph - page 89, paragraph 1	1, 5, 7, 10	
<p>* Symbol indicating the nature of the document: (1) "A" document referring to the general state of the art which is not considered to be a prior art reference; "E" English document; "F" French document; "G" German document; "I" Italian document; "J" Japanese document; "S" Spanish document; "U" United States document; "O" Other document; "P" Published document; "A" Abstract; "B" Bibliography; "C" Chemical; "D" Drawing; "E" Electrical; "F" Fluid; "G" Gas; "H" Heat; "I" Invention; "J" Judgment; "K" Knowledge; "L" Law; "M" Machine; "N" Nature; "O" Other; "P" Patent; "Q" Quality; "R" Reason; "S" Science; "T" Technology; "U" Utility; "V" Value; "W" Weight; "X" X-ray; "Y" Year; "Z" Zone.</p>			
IV. CERTIFICATION			
Date of Annual Conference of the International Board		Date of Meeting of the International Board	
03 SEPTEMBER 1993		16.09.93	
European Patent Office		European Patent Office	
EUROPEAN PATENT OFFICE		GONZALEZ ARIAS, M.L.	

3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International Application No.	
According to International Patent Classification (IPC) or to Euro Patent Classification and EPC		PCT/US 93/05996	
Int.Cl. 5 C02F3/32; C22B13/00			
4. FIELD OF SEARCH			
Classification System		Minimum (International) Standard	
Int.Cl. 5		C02F; C22B	
5. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to Claim No.	
A	JOURNAL OF THE WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION vol. 60, no. 7, July 1988, WASHINGTON US pages 1251 - 1258 ZIRSCHKY, J. ET AL. see page 1255, left column, paragraph 3	3, 5, 6	
A	DATABASE VPI Section Ch. Week 782, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C02, AK 62-12440E JP.A.5 700 180 (UTSUNOMIYA TAKASHI) 5 January 1982 cited in the application see abstract	1, 2, 4, 5, 7, 10	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.